

На правах рукописи



Феоктистова Наталья Александровна

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ РОДА *PROTEUS*, КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ИХ
ОСНОВЕ БИОПРЕПАРАТА И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ
ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

03.00.07 – микробиология

03.00.23 – биотехнология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2006

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно – санитарной экспертизы ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Васильев Дмитрий Аркадьевич
кандидат ветеринарных наук, профессор
Золотухин Сергей Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Тихомирова Елена Ивановна
доктор биологических наук, профессор
Обухов Игорь Леонидович


Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ульяновский государственный университет»

Защита диссертации состоится «24» июбря 2006 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04. в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» по адресу: 410600, г. Саратов, Театральная пл., 1. Тел./факс (8452) 74-96-20.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335. Тел./факс (8452) 69-25-32.

Автореферат разослан «23» октября 2006 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

 Л.В. Карпунина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

В последние годы, благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей, расширилось представление о роли энтеробактерий рода *Proteus* в патологии животных и человека (Paparapetropoulou, Pagonopoulou, Kouskoupi, 1997; Золотухин, 2004; 2005).

Представители данного рода широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий животных и человека. Некоторые штаммы входят в состав нормальной микрофлоры кишечника (Lamikanra, Fayinka, Olusanya, 1989; Золотухин, 2002). В то же время представители этого рода являются возбудителями внутрибольничных инфекций, энтеритов у детей и взрослых людей, способны вызывать воспалительные процессы мочевыводящих путей, быть причиной послеоперационных и ожоговых осложнений, сепсиса, дисбактериоза, токсикоинфекций и др. (Бутакова, Илинская, Юрова, 1991; Зыкин, 2003; Заркуа, Мечурчлишвили, Гадуа, 2005; Чанишвили с соавт., 2005; Золотухин, Каврук, Васильев, 2005).

Также имеется множество экспериментальных данных о патогенности названных микроорганизмов для животных. Протей выделяются при маститах, эндометритах, раневых инфекциях и других воспалительных процессах у различных видов животных. Особое внимание заслуживают работы по изучению этиологической роли протей в возникновении желудочно-кишечных заболеваний новорожденных животных (Каврук, Бритова, Гиряева, 1983; Каврук, 1986; 1994; Парайко, Парайко, 1990; Мищенко с соавт., 1999; Золотухин, 2004, Золотухин, Каврук, Васильев, 2005).

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых протеем, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по общепринятым тестам. Этот метод трудоемок и требует затрат времени, питательных сред и реактивов. Поэтому перед исследователями стоит задача изыскания более простого и доступного для лабораторий любого уровня метода индикации и идентификации названных микроорганизмов.

В ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых родов микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды предложены индикаторные бактериофаги с использованием реакции нарастания титра фага РНФ (Гольдфарб, 1961; Капырина, Бакулов, 1972; Ганюшкин, 1988; Русалеев, 1990; Кольпикова, Бакулов, Котляров, 1990; 1992; Натидзе с соавт., 2005). Методы индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичны, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны.

Цель исследования. Разработка технологических параметров по индикации и идентификации бактерий рода *Proteus* с помощью специфических бактериофагов.

Задачи исследования:

1. Изучить распространение бактерий рода *Proteus* в хозяйствах неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям молодняка сельскохозяйственных животных.

2. Выделить и селекционировать бактериофаги, активные в отношении бактерий рода *Proteus*.

3. Изучить основные биологические свойства (морфологию негативных колоний, литическую активность и ее спектр, специфичность, температурную устойчивость, устойчивость к хлороформу, морфологию фаговых корпускул, изменение литической активности при хранении) выделенных бактериофагов.

4. Подобрать оптимальный набор выделенных фагов и сконструировать на их основе новый биопрепарат-диагностикум.

5. Разработать технологические параметры изготовления биопрепарата для фагодиагностики бактерий рода *Proteus*.

6. Разработать схему ускоренной индикации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарного надзора с помощью РНФ и использованием созданного биопрепарата.

7. Разработать схему идентификации протеев с помощью бактериофагов.

Научная новизна

Получены новые штаммы бактериофагов, активные в отношении штаммов бактерий рода *Proteus*, выделенных из объектов ветеринарного надзора. Изучены основные биологические свойства выделенных фагов.

Впервые разработаны биотехнологические параметры фагоиндикации и фагоидентификации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарного надзора. Доказана эффективность использования селекционированных бактериофагов с диагностической целью.

Практическая значимость

Выделены и селекционированы специфичные бактериофаги, которые используются для изготовления диагностических препаратов. Разработаны технологические параметры по получению диагностического биопрепарата из выделенных фагов и схемы фагодиагностики.

Для конструирования биопрепарата были отобраны два фага, которые депонированы в государственной коллекции Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов ФГУ «ВГНКИ» (Справка о депонировании штамма бактериофага П-16 УГСХА от 21.02.2006 №263-3/19; Справка о депонировании штамма бактериофага П-261 УГСХА от 21.02.2006 №263-4/19) для получения патентов.

Разработана «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных протейных бактериофагов П-16 УГСХА, П-261 УГСХА», одобренная Ученым Советом Ульяновской ГСХА и утвержденная ректором академии 17.01.2006.

Для врачей-бактериологов предложены «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Proteus* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов», утвержденные Отделением ветеринарной медицины Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) (26.06.2006).

Результаты изучения биологических свойств бактериофагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА и индикации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарного надзора методом РНФ подтверждена актом производственных испытаний (от 10.01.2006), актами комиссионных испытаний в Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии (от 30.01.2006), актами комиссионных испытаний в Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ) (от 17.02.2006).

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

1. Усовершенствована схема выделения бактериофагов применительно к протеем, изучены биологические свойства выделенных и селекционированных фагов.

2. Сконструирован биопрепарат-диагностикум из селекционированных фагов и разработаны технологические параметры его изготовления для фагодиагностики бактерий рода *Proteus*.

3. Разработаны схемы ускоренной индикации бактерий *Proteus* в объектах ветеринарного надзора с помощью РНФ и идентификации протеев с использованием созданного биопрепарата.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Региональные проблемы народного хозяйства» (Ульяновск, 2004), на Научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов «Аграрная наука – развитию агропромышленного комплекса» (Ульяновск, 2004), на Всероссийской научно-практической конференции «Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы» (Ульяновск, 2005), на Международной научно-практической конференции «Молодежь и наука XXI» (Ульяновск, 2006), на Международной научной конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных» (Ульяновск, 2006).

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия» в рамках научно – исследовательской темы кафедры «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных» при творческом сотрудничестве с сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и эпидемиологии (ВНИИВСГиЭ).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические предложения, список литературных источников, 197 источников, в том числе 150 отечественных, и приложения. Работа изложена на 166 страницах и иллюстрирована 36 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Штаммы бактерий. В работе были использованы 40 штаммов бактерий рода *Proteus*: 14 штаммов были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА»; 14 штаммов получены из музея лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСГиЭ; 12 штаммов выделены из объектов ветеринарного надзора.

Использовали также 97 штаммов бактерий гетерологичных родов и семейств: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Штаммы бактериофагов. Изучались биологические свойства 22 изолятов протейных бактериофагов, выделенных из объектов ветеринарного

надзора Ульяновской и Самарской областей.

Исследуемые объекты. В качестве объектов ветеринарного надзора использовали интактные: водопроводную воду, сточные воды животноводческих ферм и общественных туалетов, фекалии животных и комбикорм, патологический материал от больных и павших животных, контаминированное бактериями рода *Proteus* мясо.

Методы. Для выделения бактерий рода *Proteus* использовали схему, изложенную в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденных Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ 11.10.1999. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), Л.И. Адельсоном (1962), С. Лурья, Д. Дарнелом (1970), А.С. Тихоненко (1968), Т.Г. Чинашвили (1968), И.М. Габриловичем (1973), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). Обнаружение бактерий рода *Proteus* в объектах окружающей среды, кормах и пищевых продуктах проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методикам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми статистическими методами (Бейли, 1962; Ашмарин, Васильев, Амбросимов, 1974; Урбах, 1975). Расчет результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Выделение бактерий рода *Proteus* из объектов ветеринарного надзора.

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий рода

Proteus из объектов ветеринарного надзора. В период с 2003 по 2006 год было исследовано на наличие бактерий рода *Proteus* 64 пробы фекалий, сточных вод, патологического материала от больных и павших животных, взятые в 10 хозяйствах Ульяновской и Самарской областей. В результате проведенных исследований было выделено 12 штаммов бактерий рода *Proteus* из проб, взятых в 7 хозяйствах, что составило 70 %.

Изучение спектра литического действия коммерческого колипротейного бактериофага. Вторым этапом наших исследований было изучение спектра литического действия коммерческого колипротейного бактериофага на 14 музейных штаммах бактерий рода *Proteus* и 12 штаммах бактерий рода *Proteus*, выделенных от животных. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения бактериофага на газон бактериальной культуры. В наших исследованиях изучаемый поливалентный бактериофаг проявил активность в отношении 11 культур, процент лизиса был равен 42,3 %.

Поиск и селекция бактериофагов. Следующим этапом работы была попытка выделить бактериофаги *Proteus* из имеющихся штаммов бактерий рода *Proteus*. Мы предполагали возможное наличие лизогенных культур, так как бактериофаги, выделенные из них, обладают более выраженной специфичностью (Жугова, 1985). В первой серии опытов использовали методику выделения бактериофагов энтеробактерий без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии опытов на культуры, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтровали через бактериальные свечи Шамберлана L-3. В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 30 секунд при помощи прибора «Изольда» с ртутной лампой ДРБ 8, 18,0 % мощности которой приходилось на область 254 нм. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Proteus* методом агаровых слоев. В наших исследованиях нам не удалось выделить фаги бактерий рода *Proteus*. Следующий этап работы был

посвящен выделению бактериофагов из объектов внешней среды. При исследовании 20 проб сточных вод и 12 проб фекалий, удалось выявить присутствие 22 изолятов фагов по наличию на газоне индикаторной культуры *Proteus* негативных колоний или зон лизиса. Для получения чистой линии фага проводили до десяти пассажей из изолированных негативных колоний по методикам, описанным И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994).

Характеристика выделенных фагов Proteus

Морфология негативных колоний. Морфологию негативных колоний изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Негативные колонии, образуемые выделенными бактериофагами, были разделены нами на пять типов. 1 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0-1,5 мм в диаметре – 7 фагов. 2 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 2,0-4,0 мм в диаметре – 4 фага. 3 тип: мутные негативные колонии округлой формы, 1,0-2,5 мм в диаметре – 6 фагов. 4 тип: менее мутные негативные колонии округлой формы с выраженным вторичным ростом бактерий в центре и ореолом по периферии, 6,0-8,0 мм в диаметре – 1 фаг. 5 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по периферии, 2,0-3,0 мм в диаметре – 2 фага.

Спектр литической активности. Для изучения спектра литической активности селекционированных фагов использовали 26 штаммов бактерий рода, проводили его методом нанесения фага на газон бактериальной культуры. Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, которые лизировали 24 штамма протеев из 26 изученных штаммов, независимо от вида, что составляет 86,5 %.

Литическая активность. Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методами Аппельмана и Грациа (Ревенко, 1978). Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что выделенные протейные бактериофаги обладали различной литической активностью,

показатели которой колебались по Appel'manu от 10^{-5} до 10^{-8} , по Грациа от $2,1 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^9$. Наиболее высокой литической активностью обладали фаги П-16 УГСХА и П-261 УГСХА: титр по Appel'manu 10^{-8} у обоих фагов, по Грациа $2,0 \times 10^9$ и $1,8 \times 10^9$, соответственно. Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага: П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, которые обладали наиболее высокими титрами по Грациа и Appel'manu и широким спектром литического действия.

Биологические свойства фагов П-16 и П-261 серии УГСХА

Спектр литической активности. Для изучения спектра литической активности бактериофагов П-16 и П-261 серии УГСХА мы использовали дополнительно 14 штаммов бактерий рода *Proteus* из музея ВНИИВСГиЭ. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Таким образом, совместный процент лизиса бактериофагов П-16 и П-261 серии УГСХА на 40 штаммах бактерий рода *Proteus* составил 95,0 %.

Таблица 1

Спектр литического действия бактериофагов П-16 и П-261 серии УГСХА

Название бактериофага	Количество исследуемых культур	Из них чувствительны к фагу	Процент лизируемых культур
П-16 УГСХА	40	22	55,0
П-261 УГСХА	40	27	67,5
Процент лизиса			95,0

Специфичность действия бактериофагов *Proteus*. Изучение специфичности двух бактериофагов *Proteus* (П-16 УГСХА, П-261 УГСХА) проводили по отношению к представителям других семейств и родов с использованием штаммов: *E.coli* - 46 штаммов, *Citrobacter spp* - 6 штаммов, *Morganella spp.* - 6 штаммов, *Klebsiella spp.* - 4 штамма, *Salmonella spp.* - 6 штаммов, *Enterobacter spp.* - 4 штамма, *Y.enterocolitica* - 12 штаммов, *Staphylococcus spp.* - 3 штамма, *Streptococcus spp.* - 2 штамма, *Pseudomonas aureginosa* - 4 штамма, *Bacillus cereus* - 3 штамма. Полученные результаты

позволяют сделать вывод, что фаги неактивны к представителям бактерий гетерологичных родов и семейств. Таким образом, селекционированные нами фаги являются специфичными для рода *Proteus*.

Температурная устойчивость бактериофагов *Proteus*. Результаты проведенных исследований позволяют применять прогревание как метод инактивации микрофлоры при работе с протейными бактериофагами, так как воздействие температуры в диапазоне 60-73 °С не понижали литическую активность бактериофагов, в то время как бактериальные клетки протеев в наших исследованиях погибали при температуре 62 °С в течение 30 минут.

Устойчивость к воздействию хлороформа. Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий (Ревенко, 1978). Определение чувствительности бактериофагов и бактерий проводили методом обработки фаговой суспензии и бульонных культур протеев хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что селекционированный бактериофаг П-16 УГСХА проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. В то время как бактериофаг П-261 УГСХА уже через 15 минут обработки хлороформом значительно терял свою активность. Обработка бактерий индикаторных штаммов *P. vulgaris* 261 и *P. vulgaris* 3 в течение 15 минут хлороформом приводила к их полной гибели.

Морфология фаговых корпускул. Для изучения морфологии фаговых корпускул проводили электронно-микроскопические исследования лизатов бульонных культур: *P. vulgaris* 261 и *P. vulgaris* 3 с бактериофагами П-16 и П-261 серии УГСХА в титре от $1,8 \times 10^9$ до $2,0 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл (по Грациа). В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фага П-16 УГСХА имеют структуры, состоящие из головки гексагональной формы размером 25 нм (± 4) и аналога отростка длиной 1,2 нм ($\pm 0,2$). Вирионы бактериофага П-261 УГСХА имеют сходные с фагом П-16 УГСХА структуры: головку гексагональной формы размером 22,5 нм ($\pm 0,2$) и

аналог отростка длиной 0,6 нм ($\pm 0,1$). В соответствии с Международной номенклатурой вирусов по морфологическим параметрам оба фага, П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, были отнесены к семейству *Podoviridae* (Murphy, 1995), по классификации А.С. Тихоненко (1968) – ко II морфологической группе: «Фаги с аналогами отростка».

Изменение литической активности при хранении. Для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата из фагов П-16 и П-261 серии УГСХА необходимо было установить изменение литической активности указанных штаммов при хранении в условиях 2-4 °С. Полученные результаты свидетельствуют о том, что селекционированные протейные бактериофаги при хранении в условиях 2-4 °С в течение 12 месяцев незначительно снижали литическую активность до 10^7 - 10^8 фаговых корпускул в 1 см³.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий *Proteus*

Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к бактериям рода *Proteus*, нами была разработана схема ускоренной идентификации этих микроорганизмов по показателям лизиса культур на плотной питательной среде. Предлагаемая нами схема позволяет идентифицировать бактерии рода *Proteus* за 48 часов (2 суток). Срок бактериологического исследования по схеме, изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», составил 96 часов (4 суток) при больших затратах посуды и реактивов.

Определение количественного показателя РНФ, имеющее диагностическое значение

Определение параметров постановки РНФ и разработку количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, проводили по методике, предложенной В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962). Проведены эксперименты с использованием МПБ, контаминированного 18 часовыми индикаторными культурами *P. vulgaris* 261 (для фага П-261 УГСХА)

и *P. vulgaris* 3 (для фага П-16 УГСХА) от 10^1 до 10^5 м.к./мл. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, образовавшихся на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Учет результатов РНФ проводили согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988): при увеличении количества частиц от 3 до 5 раз бактериофага в опытной пробе по отношению к контролю результат считался слабо положительным, при увеличении свыше 5 раз – положительным, при увеличении в 10 и более раз – резко положительным.

По результатам проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации протеом МПБ в концентрации 10^2 м.к./мл.

Установление оптимального времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями

Для решения указанной задачи необходимо было провести эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями рода *Proteus*, оптимальное время экспозиции устанавливали из шести следующих параметров:

- при предварительном подрачивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37°C , после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37°C ;

- при увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37°C .

Для изучения чувствительности РНФ, в зависимости от времени подрачивания, МПБ контаминировали бактериями рода *Proteus* в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл и инкубировали в термостате при

температуре 37 °С в течение 5, 16, 24 часов. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала, контаминированного бактериями рода *Proteus*

Фаги	№	Варианты исследований	Минимальное количество протеев, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований, (в часах)	
		Длительность подрачивания исследуемого материала	РНФ	Бактериологический метод	РНФ	Бактериологический метод
П-16	1	5	10 ²	10 ⁴	22	79
УГСХ	2	16	10 ²	10 ²	32	88
А	3	24	10 ²	10 ²	40	96
П-261	1	5	10 ²	10 ⁴	22	79
УГСХ	2	16	10 ²	10 ²	32	88
А	3	24	10 ²	10 ²	40	96

Установлено, что подрачивание материала в течение 5 часов позволяет обнаружить протей с помощью РНФ в концентрации 10² м.к./мл фагами П-261 УГСХА и П-16 УГСХА. При подрачивании исследуемого материала в течение 16 часов чувствительность реакции не повышается и позволяет обнаружить бактерии фагами П-261 УГСХА и П-16 УГСХА в количестве 10² и 10² м.к./мл, соответственно. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество протеев обнаружить удалось через 88 часов. При подрачивании исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается, также позволяет обнаружить бактерии в количестве 10² и 10² м.к./мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный бактериями рода *Proteus* в концентрации от 10¹ до 10⁵ м.к./мл, не подрачивали, а увеличивали время контакта с фагом до 5, 10, 16, 24 часов. Результаты представлены в таблице 3.

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом установлено, что

Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагами

Фаги	№	Варианты исследований	Минимальное количество протеев, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований, (в часах)	
			РНФ	Бактериологический метод	РНФ	Бактериологический метод
		Время контакта исследуемого материала с фагом часы				
П-16 УГСХ А	1	5	10^2	10^4	18	79
	2	10	10^2	10^3	23	82
	3	16	10^2	10^2	29	88
	4	24	10^2	10^2	41	96
П-261 УГСХ А	1	5	10^2	10^4	18	79
	2	10	10^2	10^3	23	82
	3	16	10^2	10^2	29	88
	4	24	10^2	10^2	41	96

увеличение времени до 5 часов позволяет обнаружить протеев с помощью РНФ в концентрации 10^2 м.к./мл фагами П-16 УГСХА и П-261 УГСХА. При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 10-16 часов чувствительность реакции не повышается, что позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и 10^2 м.к./мл, соответственно. Бактериологическим методом это же количество протеев удалось обнаружить через 88 часов. При инкубировании с фагом исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции также не увеличивается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и 10^2 м.к./мл соответственно. Бактериологическим методом протеев удавалось обнаружить в концентрации 10^2 м.к./мл, но на обнаружение затрачивается 88 часов. На основании наших данных, считаем, что наиболее оптимальным являются режимы РНФ при 5 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^2 и 10^2 м.к. в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 18 часов.

Разработка схемы постановки РНФ при помощи селекционированных бактериофагов с образцами объектов ветеринарного надзора

Пробы образцов объектов ветеринарного надзора (водопроводная вода, комбикорм, фекалии, мясо) в объеме 10 г (мл) вносили в колбы и

контаминировали *P. vulgaris* 261 и *P. vulgaris* 3 в концентрации 10^1 - 10^5 м.к./мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г (мл) пробы. Пробы мяса (кусочки свинины) растирали в фарфоровой ступке. Для контроля использовали колбы с пробами, не контаминированными бактериями *Proteus*.

По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов П-16 и П-261 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации: 10^2 м.к. протеев в 1 мл водопроводной воды, 10^3 м.к. протеев в 1 г комбикорма, 10^3 м.к. протеев в 1 г фекалий, 10^3 м.к. протеев в 1 г мяса.

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага *в условиях производства* нами были проведены исследования по фагодиагностике кишечной инфекции поросят, протекающей с участием протеев. Обнаружение проводили бактериологическим методом и с помощью РНФ.

При исследовании 11 проб фекалий от больных диареей поросят, бактериологическим методом выделено бактерий рода *Proteus* из 36 % проб, а в РНФ - 55 % проб. Результаты исследований свидетельствуют о более высокой чувствительности РНФ (18 часов) при обнаружении бактерий рода *Proteus* в испражнениях больных диареей поросят в сравнении с бактериологическим методом исследования при меньшей затрате времени (96 часов), реактивов и посуды.

Изучение эффективности поливалентного фагового препарата

В таблице 4 приведены результаты предварительного титрования фагов и их смеси на индикаторных штаммах протеев.

Таблица 4

Литическая активность протейных монофагов и их смесей

Название фага	Титр фага в моноварианта	Титр смеси фагов
П-16 УГСХА	$2,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$
П-261 УГСХА	$1,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$

Так как исходное число фаговых корпускул в смеси у каждого фага было практически в два раза меньше, то и результаты титрования смеси показали по каждой культуре двукратное уменьшение титра фага (по Грациа), что составило

$1,0 \times 10^9$ для обоих фагов соответственно. В абсолютных числах этот показатель являлся диагностическим – $1,0 \times 10^9$ корпускул при исходной концентрации обоих фагов 10^4 . Таким образом, на индикаторных культурах была установлена возможность использования смеси протейных фагов с целью индикации.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании 64 проб патологического материала и объектов ветеринарного надзора из 10 хозяйств Ульяновской и Самарской областей в 7 хозяйствах, что составило 70 %, было выделено 12 культур бактерий рода *Proteus*.

2. Выделено из объектов внешней среды 22 изолята фагов, активных по отношению к бактериям рода *Proteus* и изучены их биологические свойства.

3. Отобрано два штамма фагов П-261 УГСХА и П-16 УГСХА, которые имели титр 10^8 по Аппельману и $1,8 \times 10^9$ - $2,0 \times 10^9$ по Грациа, обладали выраженной специфичностью к штаммам бактерий рода *Proteus*, не лизировали представителей родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, сохраняли литическую активность в пределах 10^7 – 10^8 в течении 12 месяцев при хранении в условиях 2-4 °С и были термостабильными.

4. Установлено, что фаг П-16 УГСХА был устойчив к действию 10 % раствора хлороформа в течение 30 минут, а фаг П-261 УГСХА был чувствителен к данному реагенту.

5. Определено, что по морфологическим параметрам бактериофаги П-16 УГСХА и П-261 УГСХА могут быть отнесены к семейству *Podoviridae* согласно Международной номенклатуре вирусов, а по классификации А.С. Тихоненко (1968) – ко II морфологической группе: «Фаги с аналогами отростка».

6. Разработаны биотехнологические параметры изготовления и контроля специфического диагностического биопрепарата с высокой литической активностью, состоящий из двух штаммов фагов П-261 УГСХА и П-16 УГСХА.

7. Разработана схема идентификации протеев с помощью сконструированного фагового препарата, позволяющая идентифицировать бактерии рода *Proteus* за 48 часов.

8. Разработана схема ускоренной индикации бактерий рода *Proteus* с помощью РНФ в объектах ветеринарного надзора с использованием набора фагов, которая позволяет обнаружить их за 18 часов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Предложены для конструирования биопрепарата-диагностикума 2 штамма фагов П-261 УГСХА и П-16 УГСХА, активных по отношению к представителям бактерий рода *Proteus*, обладающие строгой специфичностью, широким спектром литической активности.

2. Индикацию и идентификацию бактерий рода *Proteus* предлагаем проводить с помощью набора диагностических фагов, согласно «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Proteus* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов».

3. Изготовление и контроль диагностического набора бактериофагов необходимо проводить согласно «Временной инструкции по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофагов *Proteus* П-261 УГСХА и П-16 УГСХА».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Феоктистова Н.А. Биологические особенности бактерий рода *Proteus* и их роль в патологии животных // Региональные проблемы народного хозяйства: Матер. Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых, 8-9 апреля 2004 г. – Ульяновск, 2004. – Ч. 1 – С.329-336.

2. Феоктистова Н.А., Мелехин А.С., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Выделение фагов бактерий рода *Proteus* из объектов внешней среды // Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы:

Матер. Всерос. науч.-практ. конф., 26-28 апреля 2005 г. – Ульяновск, 2005. – Ч.4,5. – С.-173-176.

3. Феоктистова Н.А., Мелехин А.С., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Изучение некоторых биологических свойств выделенных фагов бактерий рода *Proteus* // Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы: Матер. Всерос. науч.-практ. конф., 26-28 апреля 2005 г. – Ульяновск, 2005. – Ч.4,5. – С.-176-179.

4. Феоктистова Н. А. Температурная устойчивость протейных бактериофагов // Молодежь и наука XXI: Матер. Межд. науч.-практ. конф., 21-23 марта 2006 г. – Ульяновск, 2006. – Ч.1. – С.401-403.

5. Феоктистова Н.А., Юдина М.А. Устойчивость протеев и их бактериофагов к воздействию хлороформа // Молодежь и наука XXI: Матер. Междунар. науч.-практ. конф., 21-23 марта 2006 г. – Ульяновск, 2006. – Ч.1. – С.403-406.

6. Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Васильев Д.А., Тарасова А.В. Поиск бактериофагов бактерий рода *Proteus* и селекция клонов фагов // Вестник УГСХА. – Ульяновск, 2006. – №1. – С.54-56.

7. Золотухин С.Н., Васильев Д.А., Каврук Л.С., Молофеева Н.И., Пульчеровская Л.П., Коритняк, Б.М., Бульканова Е.А., Феоктистова Н.А., Пожарникова Е.Н., Мелехин А.С., Барт Н.Г., Катмакова Н.П. Выделение и селекция клонов бактериофагов патогенных бактерий // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: Матер. Междунар. науч. конф., 21-23 июня 2006 г. – Ульяновск, 2006. – С.227-231.

8. Золотухин С.Н., Мелехин А.С., Васильев Д.А., Каврук Л.С., Молофеева Н.И., Пульчеровская Л.П., Коритняк, Б.М., Бульканова Е.А., Феоктистова Н.А., Пожарникова Е.Н. Чувствительность патогенных энтеробактерий, выделенных при диареях молодняка животных к антибиотикам и специфическим бактериофагам // Профилактика, диагностика и лечение

инфекционных болезней, общих для людей и животных: Матер. Междунар. науч. конф., 21-23 июня 2006 г. – Ульяновск, 2006. – С.233-236.

9. Золотухин С.Н., Васильев Д.А., Бульканова Е.А., Феоктистова Н.А., Пожарникова Е.Н., Мелехин А.С. Бактериофаги малоизученных энтеробактерий и перспективы их применения в ветеринарии // Ветеринарная патология. – 2006. – №3. – С.80-85.

